

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/035886 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12P 19/26, C08B 37/00

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie Jose etc.;  
Cabinet Ores, 36, rue de St. Pétersbourg, F-75008 Paris  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/03617

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :  
22 octobre 2002 (22.10.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/13606 22 octobre 2001 (22.10.2001) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : AVEN-  
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, rue Raymond Aron,  
F-92160 Antony (FR).

**Publiée :**

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : CANS,  
Pierre [FR/FR]; 22, rue de la Vanne, F-91090 Lisses (FR).  
GUILLAUME, Jean-Marc [FR/FR]; 22, rue Paul Bert,  
F-75011 Paris (FR). RIGAL, Hélène, Monique, Marie  
[FR/FR]; 1 bis avenue de la Plaine, F-91390 Morsang Sur  
Orge (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*



WO 03/035886 A2

(54) Title: METHOD FOR PREPARING HEPARIN FROM MAST CELL CULTURES

(54) Titre : PREPARATION D'HEPARINE A PARTIR DE CULTURES DE MASTOCYTES

(57) Abstract: The invention concerns the production of heparin from mast cell cultures, in particular pig mast cells.

(57) Abrégé : L'invention concerne la production d'héparine à partir de cultures cellulaires de mastocytes, notamment de mastocytes de porc.

# PREPARATION D'HEPARINE A PARTIR DE CULTURES DE MASTOCYTES.

La présente invention est relative à la préparation d'héparine à partir de cultures de cellules.

L'héparine appartient à la famille des glycosaminoglycanes (GAG), qui regroupe les polysaccharides linéaires contenant une répétition d'une séquence disaccharidique se composant d'un sucre aminé (D-glucosamine ou galactosamine) et d'un acide uronique (D-glucuronique ou iduronique).

Dans le cas de l'héparine, qui appartient, avec l'héparane sulfate, à la sous-famille des glucosaminoglycanes le sucre aminé est la D-glucosamine. L'acide uronique est soit l'acide glucuronique (Glc), soit l'acide iduronique (Ido). La glucosamine peut être N-acétylée, N-sulfatée ou O-sulfatée.

Conventionnellement, on désigne sous le terme "héparine" des polysaccharides hautement sulfatés dans lesquels plus de 80% des résidus glucosamine sont N-sulfatés et le nombre de O-sulfate est plus important que celui des N-sulfates. Le rapport sulfate/disaccharide est généralement supérieur à 2 pour l'héparine. Cependant, la structure de l'héparine est en fait très hétérogène, et il existe des chaînes pouvant contenir des rapports très différents.

Comme tous les GAGs, l'héparine est synthétisée sous forme d'un protéoglycane. Cette synthèse a lieu préférentiellement dans une sous-population de mastocytes, les mastocytes séreux ou conjonctifs (CTMC). Ces mastocytes sont abondants dans la peau, et les sous-muqueuses respiratoires. Leur durée de vie est très longue (au moins 6 mois). Outre l'héparine, ils contiennent de l'héparane sulfate, et des quantités appréciables d'histamine (environ 10 pg/cellule, selon l'espèce animale).

La première étape de la synthèse de l'héparine est la formation du noyau protéique serglycine, constitué

de résidus sérine et glycine, régulièrement alternés. L'élongation de la chaîne d'héparine se fait à partir d'un tétrasaccharide, par ajouts successifs d'osamine et d'acides uroniques.

5 Le protéoglycane ainsi formé subit de nombreuses transformations séquentielles : N-désacétylation, N-sulfatation, épimérisation de l'acide D-glucuronique, et O-sulfatation.

10 Toutefois, cette maturation complète n'a lieu que sur une partie du protéoglycane, ce qui génère une grande variabilité structurale de l'héparine, responsable de son hétérogénéité.

Les chaînes de polysaccharides sont ensuite clivées de la serglycine par une endoglucuronidase. Ces  
15 chaînes ont alors un poids moléculaire entre 5000 et 30000 Da. Elles forment des complexes avec les protéases basiques et sont ainsi stockées dans les granules des mastocytes. L'héparine est excrétée uniquement lors de la dégranulation des mastocytes.

20 L'héparine joue un rôle biologique important, notamment dans l'hémostase, et est très largement utilisée en thérapeutique, en particulier en tant qu'agent anticoagulant et antithrombotique.

Actuellement, la majeure partie de l'héparine  
25 utilisée est isolée à partir de la muqueuse intestinale du porc, d'où elle est extraite par protéolyse, suivie de purification sur résine échangeuse d'anions (pour revue sur les différents procédés de préparation de l'héparine, cf. DUCLOS; « L'Héparine : fabrication, structure, propriétés,  
30 analyse »; Ed. Masson, Paris, 1984).

A l'hétérogénéité inhérente à l'héparine, s'ajoute la diversité des lots d'animaux à partir desquels elle est obtenue. Il en résulte une variabilité très importante, se traduisant notamment au niveau de l'activité  
35 biologique. En outre, il est difficile de disposer de

manière régulière d'un approvisionnement suffisant en matière première.

L'utilisation de cellules issues de mammifères pour la production de GAG ou de ou de protéoglycanes a déjà  
5 été proposée.

Ainsi la demande WO 99/26983 décrit l'obtention de composés de type héparinique, qui peuvent être des protéoglycanes (HEP-PG) ou des glycosaminoglycanes (HEP-GAG) à partir de cellules de mastocytes de rat. Les  
10 composés ne sont pas de l'héparine. Les cellules ainsi isolées ne sont pas des lignées établies. En outre le demandeur recommande la co-cultivation des cellules isolées avec des fibroblastes.

L'article de Wang et Kovanen (Circulation Research, 84, 1, 74-83, 1999) décrit lui aussi l'isolement  
15 de mastocytes séreux de rat et la production de protéoglycanes à partir de ces cellules. Comme dans la demande WO 99/26983, les cellules utilisées pour la production de protéoglycanes ne sont pas des lignées  
20 établies mais simplement des cellules isolées, puis stimulées pour produire des protéoglycanes.

La demande WO 90/14418, citée dans le rapport de recherche, décrit des lignées cellulaires obtenues à partir de mastocytomes de souris et leur utilisation pour la  
25 production d'héparine. Ces cellules ont donc une origine tumorale ce qui est susceptible de soulever des problèmes sanitaires. Un article de Montgomery et al (Proc Natl Acad Sci USA, 89, 23, 11327-11331, 1992) décrit lui aussi  
l'isolement de mastocytomes de souris.

30 La présente invention propose de pallier les inconvénients mentionnés ci-dessus et de s'affranchir des problèmes d'approvisionnement en termes de quantité et de qualité, en utilisant une source commodément disponible de matière première homogène, et aux caractéristiques stables,

facilitant l'obtention de préparations d'héparine de qualité constante.

Les Inventeurs ont constaté qu'il était possible de produire en quantité importante à partir de cultures de lignées de mastocytes, de l'héparine possédant des propriétés comparables à celles de l'héparine extraite du mucus intestinal porcin. L'utilisation de cultures cellulaires comme matière première permet en outre de contrôler les conditions de synthèse de l'héparine, et d'obtenir ainsi un produit possédant des caractéristiques reproductibles.

La présente invention a pour objet un procédé de production d'héparine, caractérisé en ce qu'il comprend la culture de mastocytes d'origine porcine et la récupération de l'héparine à partir des cultures obtenues.

De manière préférée, lesdites cultures de mastocytes sont des lignées de mastocytes d'origine porcine.

Le terme « culture » désigne ici, de manière générale, une cellule ou un ensemble de cellules cultivées *in vitro*. Une culture développée directement à partir d'un prélèvement cellulaire ou tissulaire effectué sur un animal est dénommée « culture primaire ». Le terme « lignée » est employé à partir du moment où au moins un passage, et généralement plusieurs passages consécutifs en sous-culture ont été effectués avec succès, et désigne toute culture qui en est issue. (SCHAEFFER, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 26, 91-101, 1990).

Avantageusement, lesdits mastocytes sont issus de cultures et notamment de lignées de mastocytes porcins obtenues comme décrit dans la Demande FR 0113608, ainsi que dans la Demande PCT intitulée « Cultures de mastocytes de porc et leurs utilisations » au nom de l'INRA, et de l'ENVA déposée le même jour que la présente Demande. Parmi celles-

ci, des lignées préférées pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention sont :

- la lignée de mastocytes issus de foie fœtal de porc déposée par l'INRA (147 rue de l'Université, 75007 Paris, France) auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 26, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France) le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2735 ;

- la lignée de mastocytes issus de foie fœtal de porc, et transfectés par l'antigène T du virus SV40 déposée par l'INRA auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2736 ;

- la lignée de mastocytes issus de moelle osseuse de fœtus de porc et transfectés par l'antigène T du virus SV40, déposée par l'INRA auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2734.

Préférentiellement ces mastocytes sont des mastocytes séreux.

Ces mastocytes seront de préférence cultivés dans un milieu de culture défini (MEM $\alpha$ /DMEM, RPMI, IMDM, ...) supplémenté en facteurs de croissance, utilisés en combinaison ou de façon individuelle, tels que le SCF (Stem Cell Factor) à une concentration comprise entre 1 ng/ml et 1  $\mu$ g/ml, et éventuellement l'IL3 (Interleukine 3) à une concentration comprise entre 0,1 ng/ml et 100 ng/ml, ou la PGE2 (prostaglandine E2), à une concentration comprise entre 1 nM et 1  $\mu$ M.

Les milieux peuvent également être supplémentés avec du sérum bovin, à une concentration comprise entre 0,5% et 20% (v/v).

L'addition de sérum bovin dans les milieux de culture peut être remplacée par l'utilisation d'un milieu de culture sans sérum tel que AIMV (INVITROGEN) de façon à réduire la concentration protéique du milieu et les risques



associés à l'utilisation de composés d'origine animale (KAMBE et al., J. Immunol. Methods, 240, 101-10, 200).

L'indépendance des cellules vis-à-vis de l'ajout de sérum et/ou de l'utilisation de facteurs de croissance, peut être obtenue par mutation contrôlée du phénotype cellulaire par l'action d'agents transformants et/ou immortalisants (TSUJIMURA, Pathology International, 46, 933-8, 1996 ; PIAO et BERNSTEIN, Blood, 87(8), 3117-23, 1996).

Les mastocytes peuvent être cultivés en utilisant les techniques développées pour la culture en masse de cellules eucaryotes, comme décrit par exemple par GRIFFITHS et al. (Animal Cell Biology, , Eds. Spier et Griffiths, Academic Press, Londres, vol.3, 179-220, 1986).

On peut utiliser des bioréacteurs de capacité supérieure à plusieurs m<sup>3</sup> comme décrit par PHILIPS et al. (Large Scale Mammalian Cell Culture, Eds. Feder et Tolbert, Academic Press, Orlando, U.S.A., 1985), ou par MIZRAHI (Process Biochem, Août, 9-12, 1983).

La culture peut également être réalisée en suspension ou sur micro-support selon la technique décrite par VAN MEZEL (Nature, 216, 64-65, 1967).

On peut également utiliser des systèmes de culture en lots (batch), qui sont fréquemment utilisés pour les cultures de cellules eucaryotes, du fait de leur plus grande simplicité de mise en œuvre à l'échelle industrielle (VOGEL et TODARO, Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2<sup>nd</sup> edition, Noyes Publication, Westwood, New Jersey, U.S.A., 1997). Les densités cellulaires obtenues avec ces systèmes sont généralement comprises entre 10<sup>6</sup> et 5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml.

La productivité des cultures en batch peut être avantageusement augmentée en prélevant une partie des cellules du bioréacteur (70% à 90%) pour les opérations d'extraction des GAGs et d'isolement de l'héparine et en

conservant les cellules restantes au sein du même bioréacteur pour initier une nouvelle culture. Dans ce mode de culture dit en batch répété on peut de plus distinguer les paramètres optimum de la phase de croissance cellulaire, de ceux permettant une plus grande accumulation de GAGs et d'héparine au sein des cellules.

Des systèmes de culture en continu de type perfusés, avec ou sans rétention cellulaire peuvent également être utilisés (VELEZ et al., J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987 ; CHAUBARD et al., Gen. Eng. News, 20, 18-48, 2000). Dans le cadre de la présente invention on peut notamment utiliser des systèmes de culture perfusés permettant la rétention des cellules à l'intérieur du réacteur, et aboutissant à une croissance et une production supérieures à celles pouvant être obtenues en batch. La rétention peut être effectuée par l'intermédiaire de systèmes de rétention de type filtre tournant (spin-filter), fibres creuses, ou matrice solide (WANG et al., Cytotechnology, 9, 41-49, 1992 ; VELEZ et al., J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987). Les densités cellulaires obtenues sont généralement comprises entre  $10^7$  et  $5 \times 10^7$  cellules/ml. La culture en bio-réacteurs permet, par l'utilisation de capteurs de mesure en ligne, un meilleur contrôle des paramètres physico-chimiques de la croissance cellulaire ainsi que de l'accumulation de GAGs et d'héparine au sein des cellules: pH,  $pO_2$ , Red/Ox, substrats de croissance tels que vitamines, acides aminés, substrats carbonés (par exemple glucose, fructose, galactose), métabolites tels que lactate ou ammoniacque, etc.

A partir de 3 à 30 jours de culture, généralement à partir de 3 à 10 jours, de culture dans ces conditions les cellules peuvent être récoltées et séparées du milieu de culture, généralement par centrifugation ou filtration.

Différents systèmes de centrifugation peuvent être utilisés, on citera par exemple ceux décrits par VOGEL et TODARO (Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition, Noyes Publication, Westwood, New Jersey, U.S.A.).

Alternativement, ou en combinaison avec la centrifugation, on peut effectuer la séparation par microfiltration tangentielle, à l'aide de membranes dont la porosité est inférieure au diamètre moyen des cellules (5 à 20  $\mu\text{m}$ ) tout en permettant le passage des autres composés en solution/suspension. La vitesse du flux tangentiel et la pression appliquée sur la membrane sera choisie de façon à générer peu de force de cisaillement (nombre de Reynolds inférieur à  $5000 \text{ sec}^{-1}$ ) afin de réduire le colmatage des membranes et préserver l'intégrité des cellules pendant l'opération de séparation.

Différentes membranes peuvent être utilisées, par exemple, des membranes spirales (AMICON, MILLIPORE), des membranes planes ou des fibres creuses (AMICON, MILLIPORE, SARTORIUS, PALL, GF).

On peut aussi choisir des membranes dont la porosité, la charge ou le greffage permettent d'effectuer une séparation et une première purification vis-à-vis d'éventuels contaminants pouvant être présents dans le milieu de culture, tels que protéines cellulaires, ADN, virus, ou autres macromolécules.

On peut utiliser des méthodes de production et de récolte des cellules permettant de conserver les GAGs et l'héparine dans le contenu intra-cellulaire ; toutefois on peut aussi récolter les GAGs et l'héparine dans le milieu de culture après lyse ou dégranulation des cellules.

La dégranulation peut être provoquée par la fixation de ligands spécifiques sur les récepteurs présents à la surface des mastocytes, par exemple la fixation d'agents de type allergène (tels que fragment Fc des IgE ou

analogues de ce fragment) sur les récepteurs IgE des mastocytes. Dans le cas où l'héparine a été libérée du contenu intracellulaire, par dégranulation ou lyse de tout ou partie des mastocytes, et est présente dans le milieu de culture au moment de l'étape de séparation, l'utilisation de membranes de porosité plus réduite peut aussi être envisagée. Dans ce cas, la séparation des cellules est combinée à une étape d'ultrafiltration sur une ou plusieurs membranes dont l'agencement et la porosité permet de concentrer l'héparine et de la séparer des autres espèces présentes dans le milieu, en fonction de la taille et du poids moléculaire, et éventuellement de la charge électrique, ou des propriétés biologiques.

Dans le cadre de ce mode de mise en œuvre, le seuil de coupure des membranes est de préférence compris entre 1000 et 5 KDa. On peut utiliser des systèmes de membranes similaires à ceux employés pour la micro-filtration, par exemple, membranes spirales, membranes planes, ou fibres creuses. On peut avantageusement utiliser des membranes permettant d'effectuer une séparation et une purification de l'héparine, du fait de leurs propriétés de charge, ou du greffage de ligands présentant une affinité pour l'héparine (par exemple anticorps, ATIII, lectine, peptides, nucléotides, etc ).

D'autres agents peuvent aussi induire une dégranulation des mastocytes. Ces agents peuvent être classés en plusieurs catégories telles que les agents cytotoxiques, les enzymes, les polysaccharides, les lectines, les anaphylatoxines, les composés basiques (composé 48/80, substance P, etc), le calcium (ionophore A23187, ionomycine, etc). [D. Lagunoff and T. W. Martin. 1983. Agents that release histamine from mast cells. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23:331-51]. L'utilisation d'agent de dégranulation peut être effectuée de façon répétée sur les mêmes cellules maintenues en culture. Dans ce mode de

production la productivité est augmentée de façon significative par la simplification du procédé de récolte à partir du surnageant et par le maintien en culture des cellules.

5 Dans le cas particulier de l'ionophore A23187, la dégranulation des mastocytes peut être induite par exemple par traitement de  $2.10^6$  cellules/ml de mastocytes avec l'ionophore A23187 à des concentrations comprises entre 1 à 100  $\mu\text{g/ml}$  et des temps d'action variant de 1  
10 minute à 4 heures.

La lyse des mastocytes peut être induite, par exemple, par choc osmotique en utilisant des solutions hypotoniques ou hypertoniques, par choc thermique (congélation/décongélation), par choc mécanique (par  
15 exemple sonication ou variation de pression), par action d'agents chimiques (NaOH, THESIT<sup>TM</sup>, NP40<sup>TM</sup>, TWEEN 20<sup>TM</sup>, BRIJ-58<sup>TM</sup>, TRITON X<sup>TM</sup>-100,...), ou par lyse enzymatique (papaine, trypsine,...), ou par combinaison de deux ou plusieurs de ces méthodes.

20 Pour extraire et purifier l'héparine à partir du lysat cellulaire, séparer les chaînes polysaccharidiques du noyau ser-glycine, et séparer les chaînes d'héparine des autres GAGs présents dans le milieu d'extraction, on pourra utiliser des méthodes similaires à celles utilisées dans le  
25 cadre de l'extraction et la purification d'héparine à partir de tissus animaux, qui sont connues en elles-mêmes, et décrites dans des ouvrages généraux, tels que le manuel de DUCLOS, cité ci-dessus).

A titre d'exemples non-limitatifs, pour séparer  
30 l'héparine des acides nucléiques et des protéines cellulaires, et la solubiliser, c'est à dire rompre les liaisons avec le noyau serglycine :

- on peut soumettre le lysat cellulaire à une ou plusieurs digestions enzymatiques (pronase, trypsine,  
35 papaine, etc...) ;

les liaisons héparine-protéine peuvent être hydrolysées en milieu alcalin, en présence de sulfates ou de chlorures ;

- on peut également effectuer un traitement en milieu acide (par exemple par de l'acide trichloracétique à froid) pour détruire les acides nucléiques et les protéines provenant des cellules, complété par l'utilisation d'une solution ionique qui permet de dissocier les interactions GAGs-protéines ;

- on peut également effectuer une extraction par la guanidine, après hydrolyse enzymatique ; pour purifier l'héparine solubilisée, on peut par exemple la précipiter par l'acétate de potassium, par un ammonium quaternaire, par l'acétone, etc.

Ces étapes de purification peuvent avantageusement être complétées ou remplacées par une ou plusieurs étapes de chromatographie, notamment de chromatographie d'échange d'anions ou chromatographie d'affinité.

La présente invention a également pour objet les préparations d'héparine susceptibles d'être obtenues à partir de cultures de mastocytes en mettant en œuvre un procédé selon l'invention.

Les préparations d'héparine conformes à l'invention, qui possèdent des propriétés biologiques comparables à celles des préparations d'héparine obtenues dans l'art antérieur à partir de tissus animaux, peuvent être utilisées dans toutes les applications usuelles de l'héparine.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation d'héparine à partir de cultures de mastocytes et de caractérisation de l'héparine obtenue.

## EXEMPLE 1 : EXTRACTION D'HÉPARINE À PARTIR DE CULTURES DE MASTOCYTES

### Culture des mastocytes

Une lignée de mastocytes de foie fœtal de porc, et une lignée de mastocytes de foie fœtal de porc transfectées par l'antigène T du virus SV40 des (lignées CNCM I-2735 et CNCM I-2736, respectivement), ont été utilisées ;

Les cellules sont ensemencées à raison de  $10^5$  à  $5 \times 10^5$  cellules/ml, dans du milieu MEM $\alpha$  complet en présence d'IL3 porcine (2 ng/ml) et de SCF porcin (80 ng/ml).

Les cultures sont réalisées en boîte de culture ou en suspension en flacon de 1 litre de type « spinner ». La croissance cellulaire est suivie journallement pendant 4 à 12 jours. La production d'héparine est suivie en parallèle, par l'analyse des glycosaminoglycanes produits en culture. Les résultats sont présentés dans les Figures 1 à 5.

Les Figures 1, 2 et 3 illustrent la croissance des mastocytes de foie en culture statique en boîte (Figure 1 ; ensemencement initial :  $\blacklozenge$  :  $1 \times 10^5$  cellules ;  $\blacksquare$  :  $2 \times 10^5$  cellules) et en suspension en flacon (Figure 2), et la croissance des mastocytes de foie transfectés en suspension en flacon (Figure 3).

Dans ces expérimentations, les cultures en suspension en flacon présentent une densité cellulaire maximale allant d'environ  $8 \times 10^5$  (pour les cellules non transfectées) à environ  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml (pour les cellules transfectées). Le temps de doublement, calculé pendant la phase exponentielle de croissance, est compris entre 24 et 48 heures.

### Purification des glycosaminoglycanes

Les cellules subissent une hydrolyse en milieu alcalin en présence de sel afin de rompre les

protéoglycanes et éviter les interactions GAGs/protéines de types ioniques.

Ce traitement comprend les étapes suivantes :

1. Traitement par la soude en milieu salin:  
5 cette étape vise à détruire les cellules et à couper les liaisons entre l'héparine et sa protéine mère.

L'étape comprend l'ajout de 100 µl de NaOH 1 M et de 800 µl de NaCl 0,5 M à un culot de  $10^6$  cellules. Le mélange ainsi obtenu est chauffé au bain-marie à 80°C  
10 pendant 30 minutes puis soniqué pendant 5 minutes avant d'être neutralisé avec du HCl 1 N.

2. Extraction : l'échantillon hydrolysé est déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anions (SAX, Varian), qui retient l'héparine. La colonne est lavée trois  
15 fois en tampon Tris/HCl pH 7,4, NaCl 0,5 M afin d'éliminer les protéines et les autres GAGs, notamment le dermatane. Puis l'héparine est éluée par 1 ml de tampon Tris/HCl pH 7,4, NaCl 3 M.

3. Dessalage/Lyophilisation : l'élimination du  
20 chlorure de sodium (nécessaire pour pouvoir appliquer certaines des méthodes d'analyse qui sont décrites ci-après) s'effectue par chromatographie d'exclusion stérique sur gel SEPHADEX G10, suivi par conductimétrie. Les fractions d'héparine collectées sont ensuite lyophilisées  
25 pour concentrer l'échantillon.

#### Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide

Cette technique permet de séparer les GAGs selon leur taille et leur charge, et constitue un test permettant de vérifier rapidement la présence ou l'absence d'héparine.

- 30 La préparation purifiée obtenue comme décrit ci-dessus est déposée sur gel de polyacrylamide Tris/tricine (gradient de 10 à 20%) permettant de séparer des molécules de 30 à 1 kDa, à raison de 20 µl de préparation par dépôt. On dépose sur le même gel 25 ng de  
35 dermatane, 25 ng d'héparine porcine standard SPIM (4<sup>ème</sup>



étalon international d'héparine porcine, mucus intestinal),  
 et de l'héparine extraite de mucus porcin et purifiée par  
 traitement par la soude et purification sur résine  
 échangeuse d'anions dans les mêmes conditions que celles  
 5 décrites ci-dessus.

Une double coloration avec une solution de bleu  
 alcian puis du nitrate d'argent comme décrit dans AL-HAKIM  
 et LINHARDT (Applied and Theoretical Electrophoresis 1,  
 305-12, 1991) permet de révéler les glycosaminoglycanes (le  
 10 nitrate d'argent seul ne révèle que les protéines).

Les gels sont ensuite analysés par un scanner  
 (BIO-RAD) pour quantifier les différents GAGs. La limite de  
 quantification de l'héparine est de 10 ng par bande.

Les résultats d'une expérimentation sont résumés  
 15 dans le Tableau 1 ci-dessous, dans lequel la quantité  
 d'héparine produite par les cellules est exprimée en  $\mu\text{g}/10^6$   
 cellules.

Tableau 1

Jours de récolte	3	4	5	6	7	10	11	14
Cellules foie, boîte	2,6	3,5	4,4	6,5	3,7	4,2	-	8,1
Cellules foie transfectées, boîte	2,6	6,9	9,0	11,7	10,8	8,5	5,4	7,1
Cellules foie, flacon	1,2	-	-	-	-	-	-	-
Cellules foie transfectées, flacon	-	2,1	-	-	-	-	-	-

Ces résultats sont également illustrés par la  
 20 Figure 4 (courbe = population cellulaire ; barres =  
 production d'héparine).

La Figure 4 illustre la production d'héparine au  
 cours de la croissance des mastocytes de foie en culture  
 statique en boîte.

25 Les concentrations en héparine généralement  
 observées sont comprises entre 2 et 14  $\mu\text{g}$  pour  $10^6$  cellules,  
 en culture statique et en suspension.

**EXEMPLE 2 : CARACTÉRISATION DE LA PRÉPARATION D'HÉPARINE  
OBTENUE À PARTIR DE CULTURES DE MASTOCYTES**

Profil disaccharidique par CLHP

La composition en disaccharides permet de  
5 différencier l'héparine des autres glycosaminoglycanes.

Le profil disaccharidique des  
glycosaminoglycanes produits par les mastocytes en culture  
a été déterminé selon la méthode décrite par LINHARDT et  
al. (Biomethods, 9, 183-97, 1997).

10 La préparation de GAGs obtenue comme décrit à  
l'Exemple 1 ci-dessus a été dépolymérisée par un mélange  
d'héparinases de Flavobacterium heparinium (héparinases I,  
II, et III, GRAMPIAN ENZYMES). Les conditions utilisées  
sont décrites dans la publication de LINHARDT et al., citée  
15 ci-dessus.

A titre de témoin, l'héparine standard SPIM a  
été dépolymérisée dans les mêmes conditions.

Dans ces conditions, la dépolymérisation est  
complète, et produit des disaccharides.

20 Les disaccharides principaux, au nombre de huit,  
qui sont soit N-sulfatés, soit N-acétylés sont représentés  
sur la Figure 5.

Détection par UV

Ces disaccharides sont séparés et identifiés par  
25 CLHP, sur colonne échangeuse d'anions comme décrit par  
LINHARDT et al., (cité ci-dessus).

Les résultats sont illustrés par la  
Figure 6, représentant le profil disaccharidique de la  
préparation d'héparine produite par une culture en flacon  
30 de mastocytes dérivés du foie fœtal (■), par rapport au  
profil disaccharidique de l'héparine standard (□).

Ces résultats montrent que tous les  
disaccharides présents dans l'héparine porcine de référence  
SPIM sont également présents dans l'héparine de mastocyte,

bien que dans des proportions différentes. Le rapport IS/IIS est de 3,7.

#### Détection par fluorescence

Une méthode similaire avec une détection fluorimétrique permet de quantifier uniquement les disaccharides IS et IIS, caractéristiques de l'héparine, et d'en faire le rapport.

La dépolymérisation enzymatique et la séparation CLHP sont conduites de la même manière que celle décrite ci-dessus.

La séparation est suivie d'une dérivation post-colonne, pour former un complexe fluorescent avec la guanidine.

Le disaccharide trisulfaté IS qui possède le facteur de réponse le plus fort par cette technique, est détecté et quantifié par rapport à une solution d'héparine standard de concentration connue.

La limite de détection de la méthode est de l'ordre de 5 ng/ml d'héparine dans les échantillons de culture cellulaire.

Le Tableau 2 ci-dessous illustre le rapport IS/IIS de cultures cellulaires au cours du temps.

Tableau 2

Jours de récolte	3	4	5	6	7	10	11	14
Cellules foie, boîte	1,9	1,6	1,6	1,4	1,4	1,3	-	1,4
Cellules foie transfectées, boîte	4,1	5	4,6	6,6	3,7	4,9	5,6	5,7
Cellules foie, flacon	2,3	-	-	-	-	-	-	-
Cellules foie transfectées, flacon	-	2,9	-	-	-	-	-	-

#### EXEMPLE 3 : CARACTERISATION BIOLOGIQUE DE L'HEPARINE PAR DETERMINATION DES ACTIVITES ANTI-XA ET ANTI-IIA

##### Activités biologiques

L'inactivation des facteurs Xa et IIa est caractéristique de l'héparine, et permet de la différencier de l'héparane sulfate et du dermatane.

La méthode utilisée est celle décrite dans la monographie des héparines de basse masse moléculaire de la Pharmacopée Européenne 3<sup>ème</sup> édition (1997).

La réaction se déroule en trois étapes :

- 5 1. ATIII + Héparine  $\rightarrow$  [ATIII - Héparine]
2. [ATIII - Héparine] + Facteur(excès)  $\rightarrow$  [ATIII - Héparine - Facteur] + Facteur(résiduel)
3. Facteur(résiduel) + substrat chromophore  $\rightarrow$  pNA

10 La quantité de paranitroaniline (pNA) libérée est mesurée à 405 nm. Elle est inversement proportionnelle à la quantité d'héparine.

L'activité anti-Xa ou anti-IIa est évaluée par rapport à une droite d'étalonnage établie avec le standard SPIM.

15 La sensibilité de la méthode est de 0,006 UI/ml.

Les résultats obtenus sont représentés sur le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

Jours de récolte	3	4	5	6	7	10	11	14
Cellules foie, boîte :								
Anti-Xa	2,1	1,8	5,7	4,0	2,4	2,2	-	0,0
Anti-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratio anti-Xa/anti-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellules foie transfectées, boîte :								
Anti-Xa	44	11,5	11,7	12,3	11,4	13,0	11,6	12,9
Anti-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratio anti-Xa/anti-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellules foie, flacon :								
Anti-Xa	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Anti-IIa	1,4	-	-	-	-	-	-	-
Ratio anti-Xa/anti-IIa	0,6	-	-	-	-	-	-	-
Cellules foie transfectées, flacon								
Anti-Xa	-	3,1	-	-	-	-	-	-
Anti-IIa	-	14	-	-	-	-	-	-
Ratio anti-Xa/anti-IIa	-	0,2	-	-	-	-	-	-

20 L'activité anti-Xa ou anti-IIa de l'héparine obtenue à partir de mastocytes en culture a été comparée à l'activité anti-Xa ou anti-IIa, respectivement, de l'héparine obtenue à partir de mucus porcin ou de l'héparine standard. Les résultats sont illustrés dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

	Anti-Xa (UI/mg)	Anti-IIa (UI/mg)	Xa/IIa (UI/mg)
Héparine de mastocytes	18 à 3,1	14 à 3	0,2 à 1
Héparine de mucus	80	81	1
Héparine standard	180	180	1

Caractérisation de la liaison à l'ATIII

La liaison entre l'héparine et l'ATIII est mise en évidence par un retard de migration par des techniques d'électrophorèse comme décrit dans LEE et LANDER (Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 2768-72, 1991).

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose à 0,8% dans une solution à pH 3 (acide acétique/hydroxyde de lithium).

A 100 µl d'échantillon à tester, on ajoute 100 µl de solution de concentration décroissantes de 584 à 183 µg/ml d'ATIII (origine humaine ; BIOGENIC).

Des dépôts de 100 µl d'échantillon sont faits. La migration est de 30 minutes à 100 volts.

Les gels sont fixés par une solution de bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (CETAVLON-SIGMA) à 0,1%.

La révélation est effectuée par l'Azure A (0,08% dans l'eau).

Les gels sont scannés et interprétés avec le logiciel QUANTITY ONE (BIO-RAD).

Les résultats sont exprimés en % d'héparine liée à l'ATIII.

Les résultats obtenus dans le cas d'une culture en flacon de cellules de foie transfectées sont illustrés par la Figure 7.

On observe une liaison de l'ATIII de 31% (valeur théorique 33%) en présence d'héparine standard (SPIM), et de 27% en présence de l'héparine obtenue à partir de mastocytes en culture (composé).

**EXEMPLE 4 : CULTURE DE MASTOCYTES EN BIO-RÉACTEUR EN MODE BATCH RÉPÉTÉ**

Une lignée de mastocytes issus du foie fœtal porcin non transfectée a été utilisée. Les cellules sont  
5 ensemencées à raison de 2.0 à 4.0 x10<sup>5</sup> cellules par ml dans du milieu DMEM/F12 complet additionné d'IL3 porcine (2ng/ml) de SCF porcin (80ng/ml).

Le bioréacteur utilisé a une capacité de 2 litres de milieux de culture, la tension d'oxygène de la  
10 culture est maintenue entre 20% et 40% de la saturation, le pH entre 7.0 et 7.4, la température est maintenue à 37°C +/- 0.5°C par circulation d'eau thermostatée dans la double enveloppe du bioréacteur. L'agitation de la culture est réalisée par une hélice de type marine avec une vitesse  
15 comprise entre 80 à 150 tours/minutes.

Après 4 jours de culture la densité cellulaire est de 1.3 x 10<sup>6</sup> cellules/ml, correspondant à un temps de doublement compris entre 24 et 48h. Le jour de la récolte, 80% de la culture est prélevée pour l'extraction  
20 d'héparine, le reste de la culture est maintenue dans le bio-réacteur et diluée avec du milieu frais à une concentration comprise entre 2.0 à 3.0x10<sup>5</sup> cellules/ml tel que décrit pour une opération de production en batch répété. Trois jours après dilution en mode batch répété, la  
25 densité cellulaire obtenue est de 9.0 x 10<sup>5</sup> cellules/ml, correspondant à un temps de doublement compris entre 24 et 48 heures et comparable à la première mise en culture (Figure 8).

La purification de l'héparine s'effectue comme  
30 décrit dans l'exemple 1.

L'héparine purifiée est alors analysée par HPLC, comme décrit dans l'exemple 2, en utilisant l'héparine standard SPIM à titre de témoin.

Le tableau 5 et la figure 9 représentent le  
35 profil disaccharidique et la proportion du noyau protéique

serglycine (Gly-Ser) de la préparation d'héparine produite par la culture de mastocytes en suspension dérivés du foie fœtal porcin (■), par rapport au profil obtenu pour l'héparine standard SPIM (□).

- 5 Le tableau 6 représente le profil de N-acétylation, de N-sulfatation et de O-sulfatation des disaccharides de l'héparine produite par la culture de mastocytes en suspension dérivés du foie fœtal porcin par rapport à celui des disaccharides de l'héparine SPIM standard.

10

Tableau 5

	Standard %	Culture %
Gly-Ser	3,5	3,2
IVa	4	5,4
IVs	3,1	7,6
IIa	3,1	4,4
IIIa	1,5	0,7
IIIs	8,4	11,9
IIIIs	7,2	17,1
Ia	1,3	0,2
Is	62	48,8

Tableau 6

Disaccharides	Standard %	Culture %
Acétylés	11,8	10,7
2-O-sulfatés	23	8
6-O-sulfatés	42	42
N-Sulfatés	83	85
2-O-sulfatés	84	77
6-O-sulfatés	89	71
Sulfates/carboxylates	2,4	2,1

Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'on utilise une lignée de mastocytes transfectés par l'antigène T du virus SV40.

- 15 EXEMPLE 5 : PRODUCTION D'HÉPARINE DANS LE SURNAGEANT DE CULTURE PAR MISE EN ŒUVRE D'UN AGENT DE DÉGRANULATION.

Les expérimentations ont été effectuées sur une lignée de mastocytes de foie fœtal non-transfectés.

- 20 Au 762<sup>ème</sup> jour (compté à partir de la première mise en culture), la concentration de mastocytes a été ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/ml, et la culture est incubée pendant une heure en milieu MEM comprenant 4µg/ml de

l'ionophore A23187, ce qui induit la dégranulation des mastocytes.

Les GAGs totaux, et les GAGs sécrétés produits par les cellules sont quantifiés en PAGE. La Figure 10  
5 montre que 70 à 75 % des GAGs sont retrouvés dans le surnageant après traitement par l'ionophore A23187, contre environ 10% dans les cellules non traitées (0 µg/ml de A23187).

Les mastocytes pour lesquels la récolte de GAGs  
10 a été réalisée au 762<sup>ème</sup> jour de culture ont été remis en culture. On n'observe aucune perte de viabilité et de vitesse de croissance.

21 jours plus tard, ces mastocytes sont soumis à une nouvelle dégranulation, et les GAGs sont dosés comme  
15 décrit ci-dessus. Une culture de mastocytes du même âge, n'ayant pas subi de dégranulation au 762<sup>ème</sup> jour est utilisée à titre de contrôle.

Les résultats sont illustrés par la Figure 10 qui montre que le pourcentages de GAGs sécrétés est  
20 comparable à celui obtenu lors de la première dégranulation et aussi comparable à celui obtenu avec les cellules contrôle du même âge.

Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'on utilise une lignée de mastocytes transfectés par  
25 l'antigène T du virus SV40.



## REVENDICATIONS

1) Procédé de production d'héparine, caractérisé en ce qu'il comprend la culture de mastocytes d'origine porcine et la récupération de l'héparine à partir des 5 cultures obtenues.

2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que lesdites cultures de mastocytes sont des lignées de mastocytes d'origine porcine.

3) Procédé selon une quelconque des 10 revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdits mastocytes sont issus de moelle osseuse de fœtus de porc ou de foie fœtal de porc.

4) Procédé selon une quelconque des 15 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdits mastocytes sont des mastocytes séreux.

5) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que lesdits mastocytes sont issus d'une lignée de mastocytes choisie parmi :

- la lignée déposée auprès de la CNCM le 20 17 octobre 2001, sous le numéro I-2735 ;

- la lignée déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2736 ;

- la lignée déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2734.

25 6) Préparation d'héparine susceptible d'être obtenue par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 5.

1 / 10

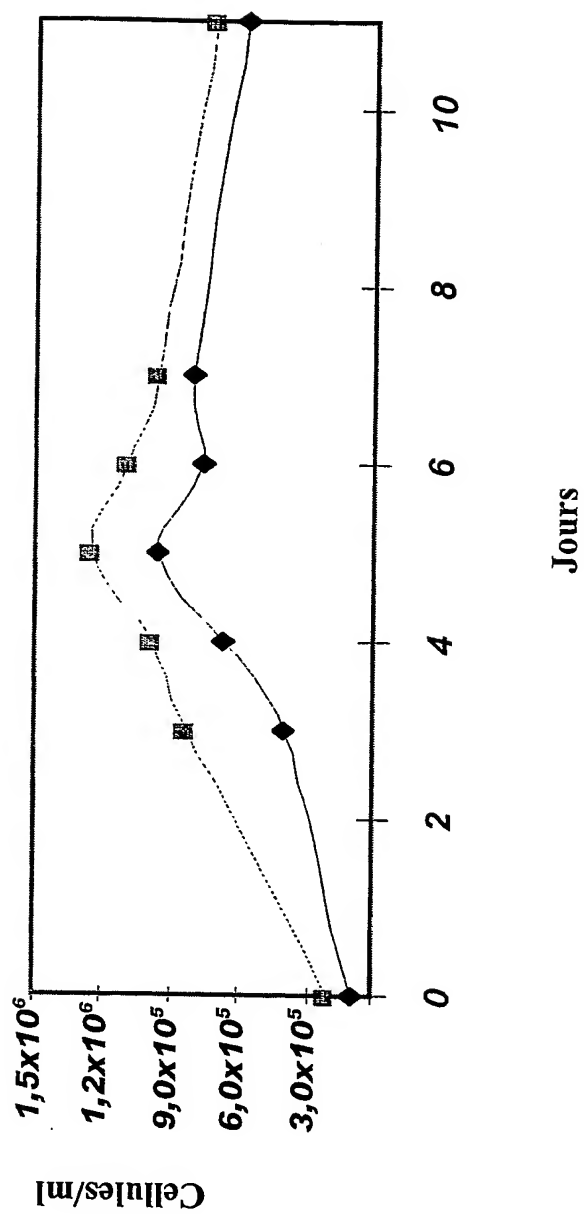
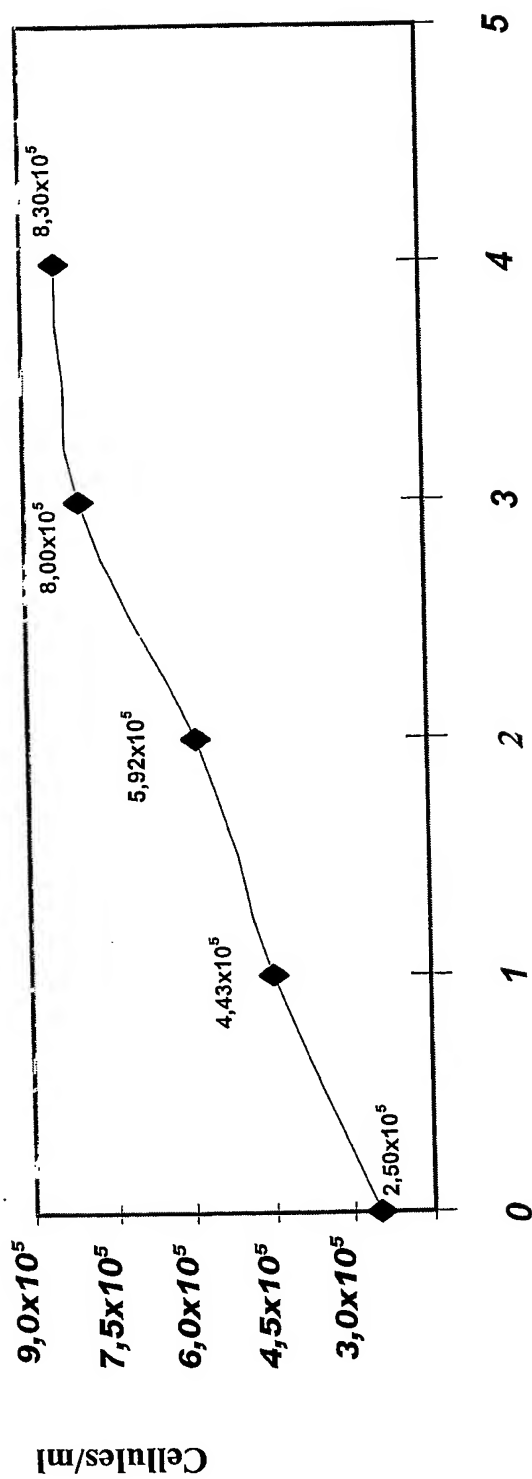


Figure 1

2 / 10



Jours

Figure 2

3 / 10

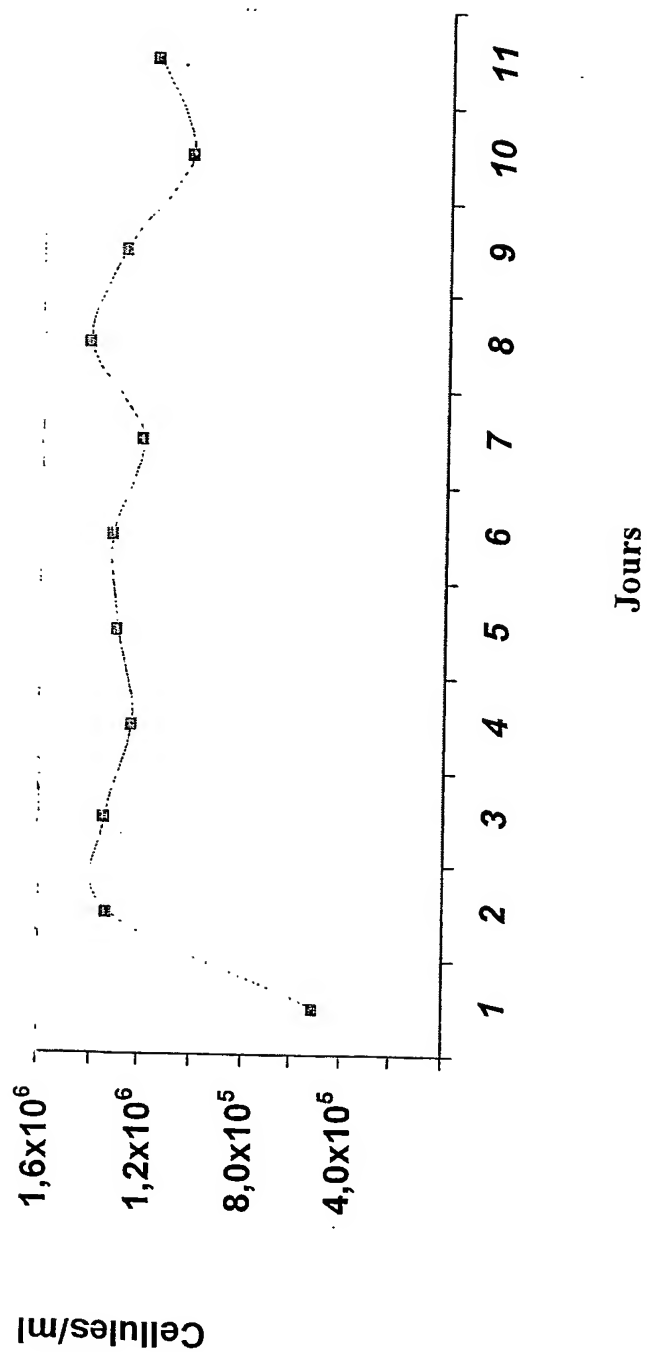


Figure 3

4 / 10

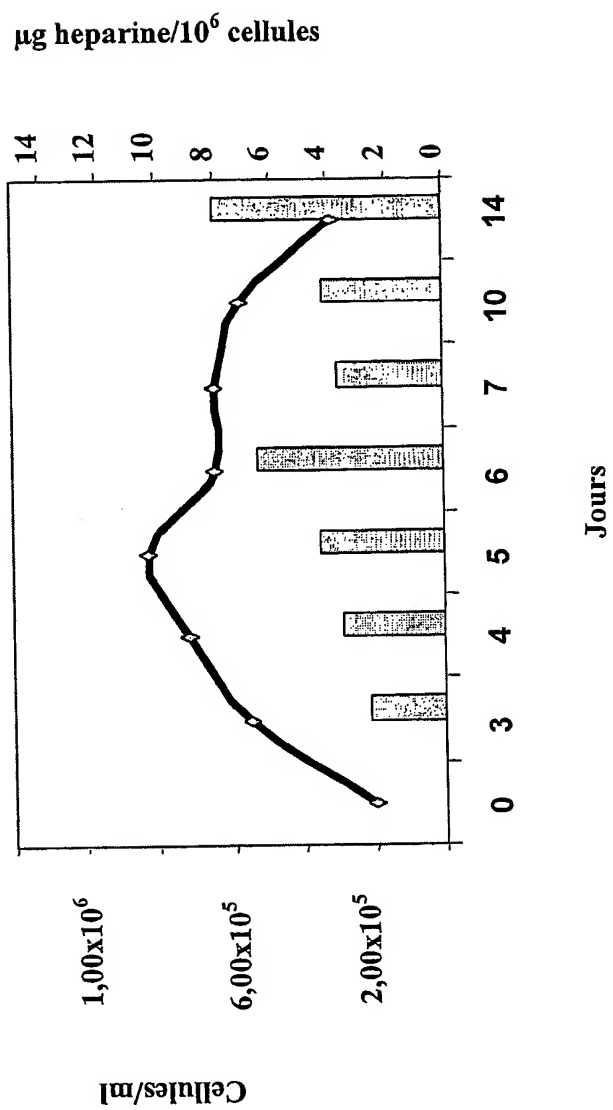


Figure 4

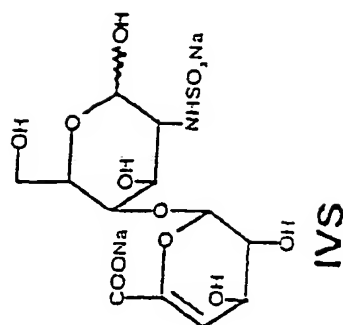
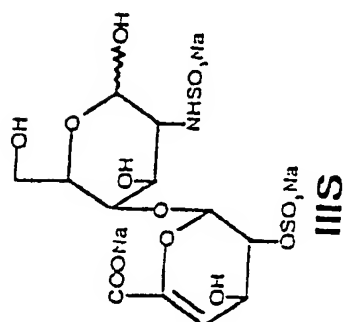
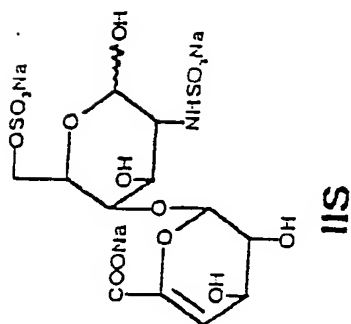
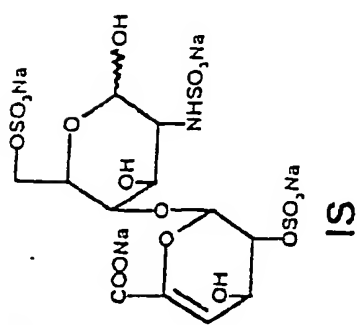
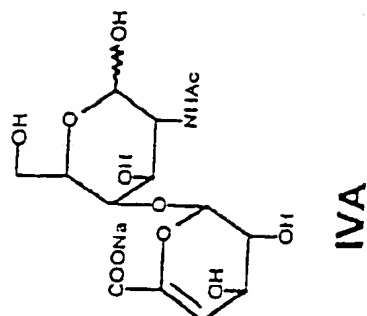
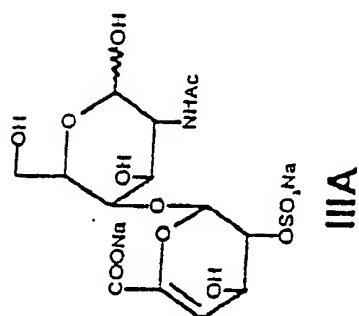
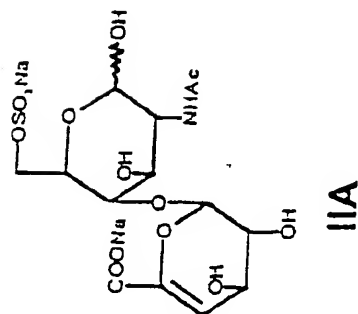
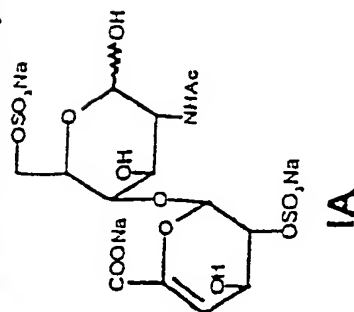
disaccharides N-sulfatés :disaccharides N-acétylés :

Figure 5

6 / 10

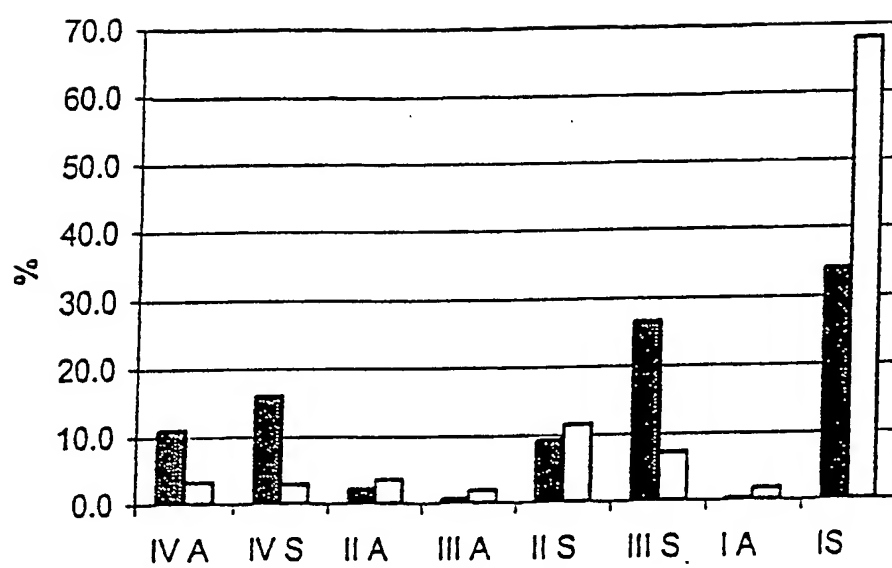


Figure 6

7 / 10

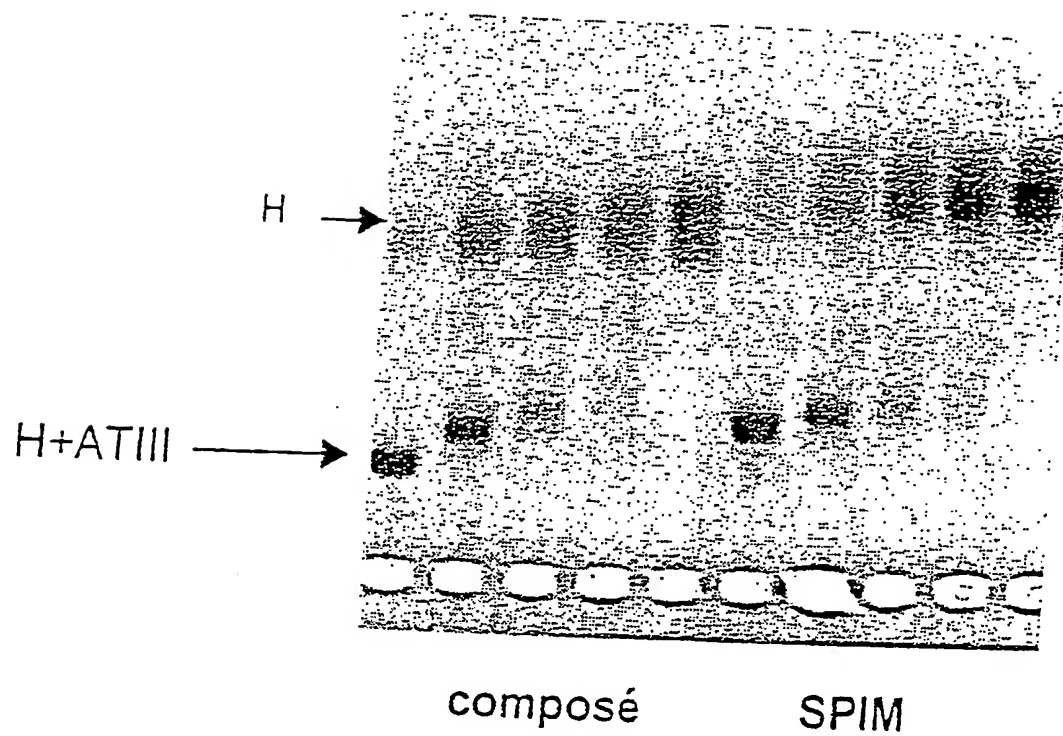


Figure 7



8 / 10

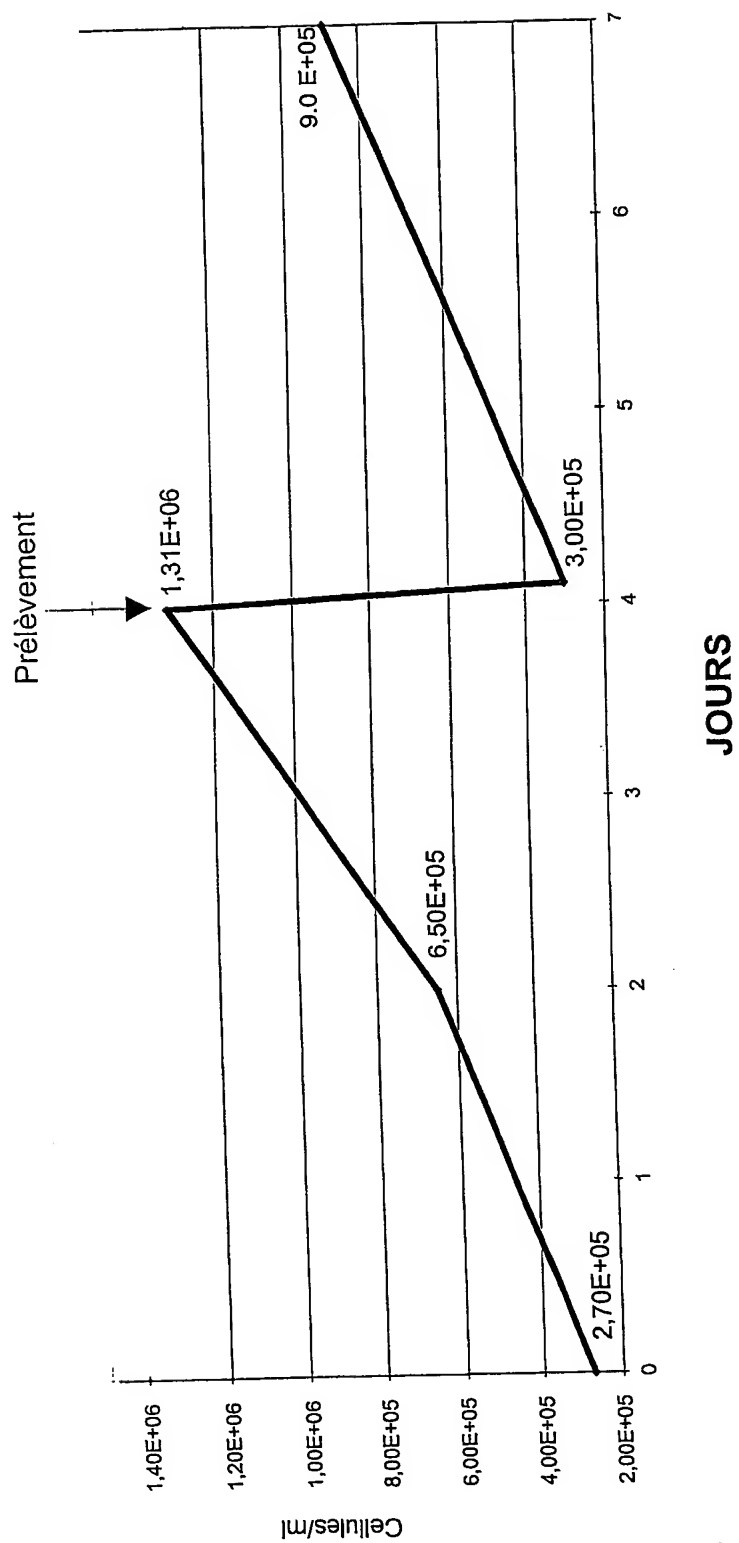
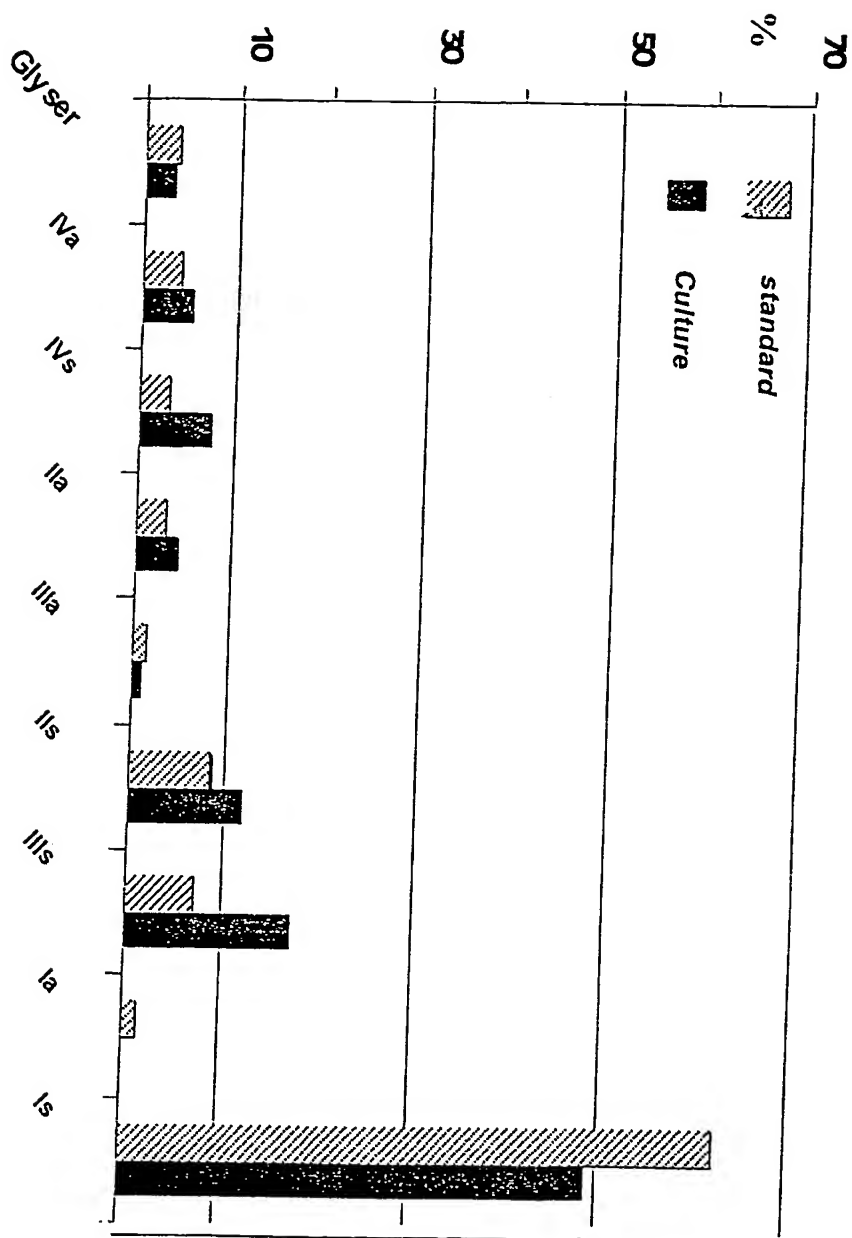


Figure 8

9 / 10

Figure 9



10 / 10

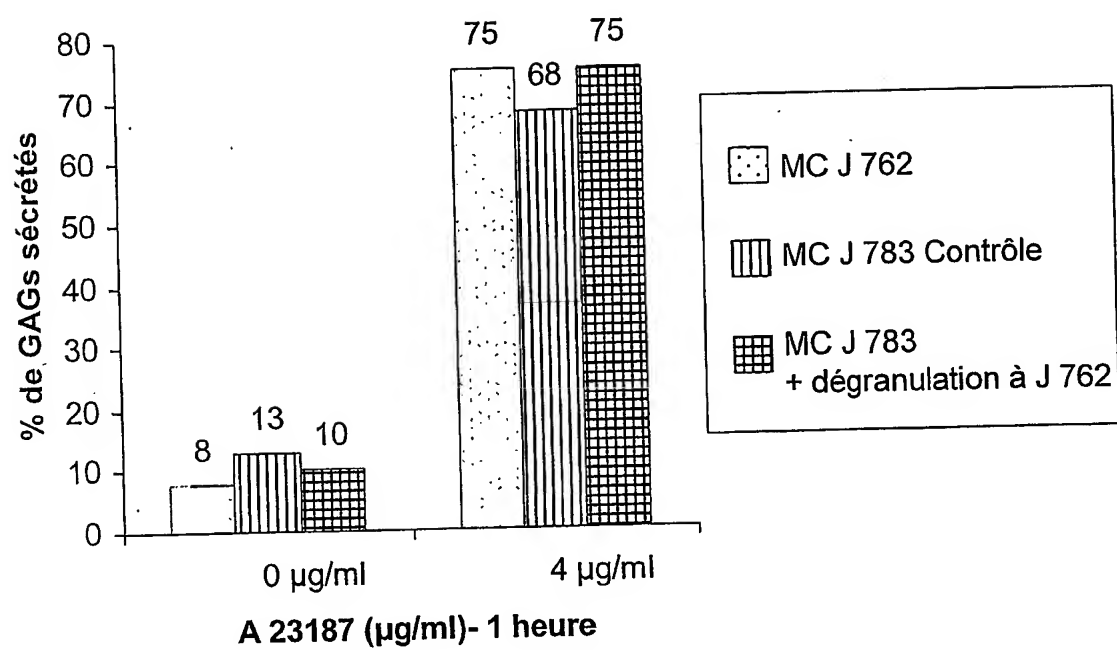


Figure 10

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPbv041/55	Demande internationale n°	PCT/FR02/03617
--	-------------	------------------------------	----------------

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page 5 _____, ligne 13-16 _____.	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT	
D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt	
Collection nationale de cultures de micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> )	
Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt	n° d'ordre
17 octobre 2001	I-2734
C. INDICATION SUPPLEMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> )	
Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
« Jusqu'à ce qu'un brevet canadien ait été délivré ou que la demande ait été refusée, abandonnée ou retirée, les échantillons du micro-organisme désigné ci-dessus ne pourront être remis qu'à un expert désigné par le Commissaire aux Brevets ».	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés</i> )	
CA	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MIPbv041/55	Demande internationale n°	PCT/FR02/03617
---	-------------	---------------------------	----------------

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>5</u> , ligne <u>3-8</u>	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT	
D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt	
Collection nationale de cultures de micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays)	
Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt	n° d'ordre
17 octobre 2001	I-2735
C. INDICATION SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant)	
Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
« Jusqu'à ce qu'un brevet canadien ait été délivré ou que la demande ait été refusée, abandonnée ou retirée, les échantillons du micro-organisme désigné ci-dessus ne pourront être remis qu'à un expert désigné par le Commissaire aux Brevets ».	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
CA	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du  
déposant ou du mandataire

MJPbv041/55

Demande internationale n°

PCT/FR02/03617

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

<b>A.</b> Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>5</u> , ligne <u>9-12</u>	
<b>B. IDENTIFICATION DU DEPOT</b> <div style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></div>	
Nom de l'institution de dépôt Collection nationale de cultures de micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17 octobre 2001	n° d'ordre I-2736
<b>C. INDICATION SUPPLEMENTAIRES</b> ( <i>le cas échéant</i> ) <div style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></div>	
« Jusqu'à ce qu'un brevet canadien ait été délivré ou que la demande ait été refusée, abandonnée ou retirée, les échantillons du micro-organisme désigné ci-dessus ne pourront être remis qu'à un expert désigné par le Commissaire aux Brevets ».	
<b>D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES</b> ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés</i> )	
CA	
<b>E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT</b> ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur

☐

Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale

Fonctionnaire autorisé

Réservé au Bureau international

☐

Cette feuille est parvenue au Bureau international le :

Fonctionnaire autorisé

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPbv041/55	Demande internationale n°	PCT/FR02/03617
---	-------------	---------------------------	----------------

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page 5, ligne 13-16	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT	
D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17 octobre 2001	n° d'ordre I-2734
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant)	
Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
« En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant dans les conditions définies à la règle 28.4 CBE ».	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
EP : (AT, BE, BG, CH&LI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR)	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPbv041/55	Demande internationale n°	PCT/FR02/03617
---	-------------	---------------------------	----------------

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page 5 _____, ligne 3-8 _____.	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17 octobre 2001	n° d'ordre I-2735
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
« En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant dans les conditions définies à la règle 28.4 CBE ».	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés</i> )	
EP : (AT, BE, BG, CH&LI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR)	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	



Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPbv041/55	Demande internationale n°	PCT/FR02/03617
---	-------------	---------------------------	----------------

## INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page 5 _____, ligne 9-12 _____	
B. IDENTIFICATION DU DEPOT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt 17 octobre 2001	n° d'ordre I-2736
C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
« En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant dans les conditions définies à la règle 28.4 CBE ».	
D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES (si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)	
EP : (AT, BE, BG, CH&LI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR)	
E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Applicant: GUILLAUME, et al.  
Filing Date: 4/13/2004  
Application No.: 10/823,142  
Docket No.: FRAV2003/0009 US NP  
**PRIOR ART**